



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 28 280.7

Anmeldetag: 23. Juni 2003

Anmelder/Inhaber: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung eV, 80686 München/DE

Erstanmelder: Universität zu Lübeck,
23562 Lübeck/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung adulter pluripotenter
Stammzellen

IPC: C 12 N 5/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Letang

Verfahren zur Herstellung adulter pluripotenter Stammzellen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung adulter pluripotenter Stammzellen. Als Stammzellen werden solche Zellen bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen, sich unbegrenzt zu teilen und sich unter geeigneten Umständen bzw. durch geeignete Stimuli in verschiedene Zellarten differenzieren zu können. Stammzellen besitzen das Potenzial, sich in Zellen mit charakteristischer Gestalt und spezialisierten Funktionen zu entwickeln.

Aufgrund ihrer unterschiedlich ausgeprägten Potenz, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, unterscheidet man embryonale von adulten Stammzellen. Es besteht die allgemeine Ansicht, dass mit der Entwicklung von der befruchteten Eizelle über das embryonale Stadium bis zum adulten Organismus die Potenz der Stammzellen abnimmt. Dieser Eigenschaft entsprechend wird die befruchtete Eizelle als totipotent, embryonale Stammzellen als pluripotent und adulte Stammzellen als multipotent bezeichnet.

Totipente Zellen sind Zellen aus denen sich ein vollständiger Organismus entwickeln kann; dazu zählen neben der befruchteten Eizelle auch die Zellen der frühen embryonalen Phase. Unter Pluripotenz versteht man, dass die typischerweise aus der inneren Zellmasse von disaggregierten Blastozysten gewonnenen embryonalen Stammzellen in der Lage sind, sich in Zellen aller drei Keimblätter – Mesoderm, Entoderm und Ektoderm – zu differenzieren. Adulten Stammzellen hingegen wird nur eine Multipotenz zugesprochen, d.h. dass eine Differenzierung in nur sehr geringem Umfang stattfinden kann. So können sich z.B. hematopoietische Stammzellen ausschließlich in blutbildende Zellen differenzieren (vgl. ORKIN und MORRISON 2002).

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, adulte pluripotente Stammzellen herzustellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch Entnehmen acinären Gewebes, Zerkleinern des acinären Gewebes, Kultivieren des zerkleinerten acinären Gewebes, Vermehren der in Kultur persistierenden Zellen, Überführen in hängende Tropfen, Bilden lassen von Zellverbänden und Übertragen der Zellverbände in Suspensionskultur.

Es ist ausgesprochen überraschend, dass das erfindungsgemäße Verfahren die Herstellung adulter Stammzellen ermöglicht, die in ihrem Differenzierungspotenzial gegenüber embryonalen Stammzellen keine Unterschiede aufweisen und als pluripotent bezeichnet werden können. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugten Stammzellen sind leicht zu gewinnen und differenzieren reproduzierbar spontan in die verschiedenen Zelltypen der drei Keimblätter. Zur Differenzierung ist kein *Feeder Layer* notwendig und die Zellen müssen auch nicht transplantiert werden um zu differenzieren. Darüber hinaus können die so produzierten Stammzellen eingefroren gelagert werden und behalten ihre Differenzierbarkeit und Vitalität unverändert bei.

Das erfindungsgemäße Verfahren findet seine Anwendung in der Bereitstellung komplexer zellulärer Systeme z.B. zur Auswertung zellulärer Interaktionen oder zur Analyse der Wirkung verschiedener Noxen, Chemikalien oder auch Kosmetika. Des Weiteren bieten adulte Stammzellen den Vorteil, dass autologe Zellen zur Bildung von Gewebeersatz erzeugt und transplantiert werden können, die keine Abstoßungsreaktion hervorrufen und zudem auch gegenüber embryonalen Stammzellen als ethisch unbedenklich betrachtet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand von Zeichnungen erläutert. Dabei zeigt

- Fig. 1 eine schematische Darstellung des Ablaufs des Verfahrens,
- Fig. 2 den Nachweis von Epithel- und Drüsenzellen mit entodermalen Eigenschaften, die ausgehend von mit dem vorliegenden Verfahren erzeugten Stammzellen hergestellt wurden und
- Fig. 3 den Nachweis von Muskelzellen mit mesodermalen und Nervenzellen mit ektodermalen Eigenschaften, die ausgehend von mit dem vorliegenden Verfahren erzeugten Stammzellen hergestellt wurden.

Nach Fig. 1 wird zur Gewinnung der Zellen acinäres Gewebe – bevorzugt der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) – mechanisch und enzymatisch zerkleinert in Kultur genommen [10]. Entgegen den Angaben von BACHEM et al. (1998) und GROSFILS et al. (1993) werden keine Gewebeblöcke kultiviert aus denen Zellen auswachsen sollen, sondern unter der Bedingung, dass die Zellverbände der Acini weitestgehend intakt bleiben, das Gewebe stärker zerkleinert.

Über mehrere Wochen werden diese Zellen und Zellverbände in Kulturgefäßen kultiviert. Alle 2-3 Tage wird das Medium gewechselt, wobei alle differenzierten Zellen entfernt werden. Bei den in Kultur persistierenden Zellen handelt es sich um undifferenzierte Zellen mit uneingeschränkter Teilungsfähigkeit.

Ähnliche Zellen sind unter gleichen Bedingungen beschrieben und als eine Art Myofibroblasten bzw. pankreatische Sternzellen bezeichnet worden (BACHEM et al. 1998). Im Gegensatz zum Verfahren der vorliegenden Erfindung konnte eine uneingeschränkte Teilungsfähigkeit jedoch nicht beobachtet werden. Weiterhin konnten diese Zellen auch nicht unbegrenzt passagiert werden ohne an Vitalität zu verlieren.

In einem zweiten Schritt [12] werden ungefähr 400 bis 800 Zellen in je 20 µl Medium in hängenden Tropfen kultiviert. Dazu werden die Tropfen auf Deckel von bakteriologischen Petrischalen gegeben, umgedreht und über die mit Medium gefüllte Petrischale gelegt, sodass die Tropfen nach unten hängen.

Durch diese Art der Kultivierung bilden sich innerhalb von 48 h, in Anlehnung an bereits beschriebene „embryoid bodies“, vom Erfinder der vorliegenden Erfindung als „organoid bodies“ bezeichnete Zellaggregate [14], die für ungefähr 6 Tage in eine Suspensionskultur umgesetzt werden [16]. Die Teilansicht [18] aus Fig. 1 zeigt eine mikroskopische Aufnahme eines solchen Organoid Body.

Die in Suspensionskultur wachsenden Organoid Bodies bilden neue Organoid Bodies, die auch bei Einzelzellen die Bildung von neuen Organoid Bodies induzieren. Die Zellen sind sowohl als Organoid Bodies als auch als Einzelzellen einfrierbar und behalten dabei ihre Vitalität und ihr Differenzierungspotenzial.

Fig. 2 zeigt den immunhistologischen Nachweis von nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten differenzierten Zellen mit entodermalen Eigenschaften aus Ratten. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen Cytokeratin und Amylase angefärbt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

Fig. 3 zeigt den immunhistologischen Nachweis von nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten differenzierten Muskelzellen mit mesodermalen und Nervenzellen mit ektodermalen Eigenschaften aus Ratten. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen α -smooth-muscle-actin (SMA) und Neurofilament (NF) angefärbt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen können dabei sogar Zellkontakte zwischen den Nerven- und den Muskelzellen beobachtet werden (nicht gezeigt).

Insgesamt konnten bisher folgende Marker für spezifische Zellen positiv getestet werden: PGP 9,5 und NF für Nervenzellen, S 100 und GFAP für Gliazellen, SMA für Muskelzellen (bzw. Myofibroblasten), Kollagen Typ II für Knorpelzellen, Amylase und Trypsin für exokrine Drüsenzellen, Insulin für endokrine Drüsenzellen, Vigilin für stark translatierende Zellen und Cytokeratin für epidermale Zellen. Neben den lichtmikroskopischen Untersuchungen konnten auch elektronenmikroskopisch verschiedene Zelltypen morphologisch charakterisiert werden, sowie Zell-Zell-Kontakte als Zeichen für zelluläre Interaktionen gefunden werden.

In einem Beispiel sollen die vorzugsweise verwendeten Arbeitsschritte des Verfahrens näher dargelegt werden:

Die allgemeinen Arbeitsanweisungen, wie sie für Verfahren zur Kultivierung von tierischen Zellen und insbesondere von Säugetierzellen gebräuchlich sind, sind zu beachten. Eine sterile Umgebung, in der das Verfahren durchgeführt werden soll, ist – auch wenn hierzu keine weitere Beschreibung erfolgt – in jedem Fall einzuhalten. Folgende Puffer und Medien müssen bereitgestellt werden:

HEPES-Stammlösung (pH 7,6)	2,383 g HEPES auf 100 ml <i>A. bidest.</i>
HEPES-Eagle-Medium (pH 7,4)	90 ml Modified Eagle Medium (MEM) 10 ml HEPES-Stammlösung
Isolationsmedium (pH 7,4)	32 ml HEPES-Eagle-Medium 8 ml 5% BSA in <i>A. bidest.</i> 300 μ l 0,1 M CaCl_2 100 μ l Trasylol (200.000 KIE)

Digestionsmedium (pH 7,4)	20 ml Isolationsmedium 4 ml Kollagenase
Inkubationsmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Differenzierungsmedium	380 ml DMEM 95 ml 30 min bei 54 °C inaktiviertes FCS 5 ml Glutamin (GIBCO BRL) 5 ml (3,5 µl β-Mercaptoethanol auf 5 ml PBS) 5 ml Non-essential amino acids (GIBCO BRL) 5 ml Penicillin/Streptomycin (GIBCO BRL)

1. Präparation des Gewebes und Isolierung der Zellen

In den *Ductus pancreaticus* von 2-3 Jahre alten Ratten werden mittels einer Spritze und einer stumpfen Kanüle bei der Ratte 10 ml Digestionsmedium langsam und luftblasenfrei injiziert. Das gesamte Pankreas wird dadurch aufgeblasen und kann so besser herauspräpariert werden. Das Pankreas wird dann in ein Becherglas überführt und weitere 5 ml Digestionsmedium dazugegeben. Nachdem man das Fettgewebe und Lymphknoten entfernt hat wird das Gewebe im Becherglas mit einer feinen Schere zerkleinert. Die Suspension wird anschließend 1 min mit Carbogen begast und für 20 min bei 37 °C in einem Schüttler bei 200 Zyklen/min inkubiert. Danach saugt man das Medium vorsichtig ab und wäscht die Gewebestücke zweimal mit je 10 ml Isolationsmedium und gibt wieder 5 ml Digestionsmedium zum Gewebe hinzu.

Nach erneutem Begasen mit Carbogen für 1 min und Inkubation für 15 min bei 37 °C in einem Schüttler bei 200 Zyklen/min werden die Gewebestücke durch sukzessives Aufziehen in jeweils einer 10 ml, 5ml, 2 ml und 1 ml Glaspipette zerkleinert und durch einlagiges Filtergewebe gepresst. Die so vereinzelter Zellen werden nun fünfmal in Inkubationsmedium gewaschen (37 °C), mit Carbogen begast und jedes Mal 5 min bei 90 g zentrifugiert. Das zuletzt erhaltene Pellet wird in Inkubationsmedium resuspendiert, begast und auf Gewebekulturschalen verteilt.

2. Kultivierung der Zellen

Die Gewebekulturschalen mit den isolierten Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle 2-3 Tage wird das Medium gewechselt. Dabei werden alle differenzierten Zellen entfernt.

Am siebenten Tag in Kultur werden die Zellen mit einer Lösung bestehend aus 2 ml PBS, 1 ml Trypsin und 2 ml Inkubationsmedium passagiert. Dabei lösen sich die Zellen vom Boden der Kulturschale. Die Zellsuspension wird 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 2 ml Inkubationsmedium resuspendiert, auf eine mittlere Zellkulturflasche überführt und 10 ml Inkubationsmedium dazugegeben. Der Medienwechsel erfolgt alle drei Tage.

Am vierzehnten Tag in Kultur werden die Zellen erneut, aber diesmal mit 6 ml PBS, 3 ml Trypsin und 6 ml Inkubationsmedium, passagiert. Die Zellsuspension wird 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 6 ml Inkubationsmedium resuspendiert, auf 3 mittlere Zellkulturflaschen überführt und jeweils 10 ml Inkubationsmedium dazugegeben.

Die Zellen werden weiter kultiviert und so oft passagiert und ausgesät bis die Zellen einen semikonfluenten bis konfluenten Zustand erreichen.

3. Herstellung von Organoid Bodies

Die undifferenzierten Zellen werden mit einer Lösung aus 10 ml PBS, 4 ml Trypsin, 8 ml Differenzierungsmedium abtrypsiniert und 5 Minuten abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wird so in Differenzierungsmedium resuspendiert, dass sich eine Verdünnung von 3000 Zellen je 100 µl Medium einstellt. Anschließend werden die Zellen nochmals gut mit einer 3 ml Pipette suspendiert

Von bakteriologischen Petrischalen, die vorher mit jeweils 15 ml PBS (37 °C) pro Platte beschichtet worden sind, wird der Deckel abgenommen und umgedreht. Mit Hilfe einer automatischen Pipette werden auf einen Deckel ca. fünfzig 20 µl Tropfen gegeben. Der Deckel wird dann schnell umgedreht und auf die mit Differenzierungsmedium gefüllte

Petrischale gegeben, sodass die Tropfen nach unten hängen. Die Petrischalen werden anschließend vorsichtig in den Brutschrank gestellt und für 48 h inkubiert.

Daraufhin werden die in den hängenden Tropfen aggregierten Zellen, die hier Organoid Bodies (OB) genannt werden sollen, aus jeweils vier Deckeln in je eine bakteriologische Petrischale mit 5 ml Inkubationsmedium mit 20 % FKS überführt und für weitere 96 h kultiviert.

Die Organoid Bodies werden nun vorsichtig mit einer Pipette aufgesammelt und in mit 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturgefäße mit Differenzierungsmedium überführt. In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens verwendet man als Kulturgefäß mit 0,1 % Gelatine beschichtete 6 cm Petrischalen, in die 4 ml Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und die anschließend mit je 6 Organoid Bodies beschickt werden. Ein weiteres bevorzugtes Kulturgefäß sind mit 0,1 % Gelatine beschichtete Chamber Slides, in die 3 ml Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und die anschließend mit je 3-8 Organoid Bodies beschickt werden. Daneben können auch 24-well-Mikrotiterplatten verwendet werden, die mit 0,1 % Gelatine beschichtet wurden und in die je 1,5 ml pro well Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und anschließend mit je 4 Organoid Bodies beschickt werden.

Derart kultiviert, ist die Differenzierungsfähigkeit der Zellen in den Organoid Bodies aktiviert und die Zellen differenzieren sich in Zellen der drei Keimblätter Mesoderm, Entoderm und Ektoderm. Damit erfüllen sie die Definition von pluripotenten Stammzellen. Die Zellen können sowohl als Organoid Bodies als auch als einzelne Zellen gelagert und kultiviert werden und behalten ihre Pluripotenz.

Literaturverzeichnis

BACHEM MG, SCHNEIDER E, GROSS H, WEIDENBACH H, SCHMID RM, MENKE A, SIECH M, BEGER H, GRUNERT A, ADLER G. (1998) Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterol.* 115: 421-432.

GROSFILS K, METIOUI M, TIOULI M, DEHAYE JP. (1993) Isolation of rat pancreatic acini with crude collagenase and permeabilization of these acini with Streptolysin O. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 79(1):99-115.

ORKIN SH, MORRISON SJ. (2002) Biomedicine: Stem-cell competition. *Nature.* 418:25-27.

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung adulter pluripotenter Stammzellen

gekennzeichnet durch

Entnehmen acinären Gewebes,

Zerkleinern des acinären Gewebes,

Kultivieren des zerkleinerten acinären Gewebes (10),

Vermehren der in Kultur persisitierenden Zellen,

Überführen in hängende Tropfen (12),

Bilden lassen von Zellverbänden (14) und

Übertragen der Zellverbände in Suspensionskultur (16).

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das acinäre Gewebe Pankreasgewebe ist.

3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das acinäre Gewebe einem Säugetier entnommen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Säugetier ein Primat ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Primat ein Mensch ist.

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung adulter pluripotenter Stammzellen gekennzeichnet durch Entnehmen acinären Gewebes, Zerkleinern des acinären Gewebes, Kultivieren des zerkleinerten acinären Gewebes (10), Vermehren der in Kultur persisitierenden Zellen, Überführen in hängende Tropfen (12), Bilden lassen von Zellverbänden (14) und Übertragen der Zellverbände in Suspensionskultur (16).

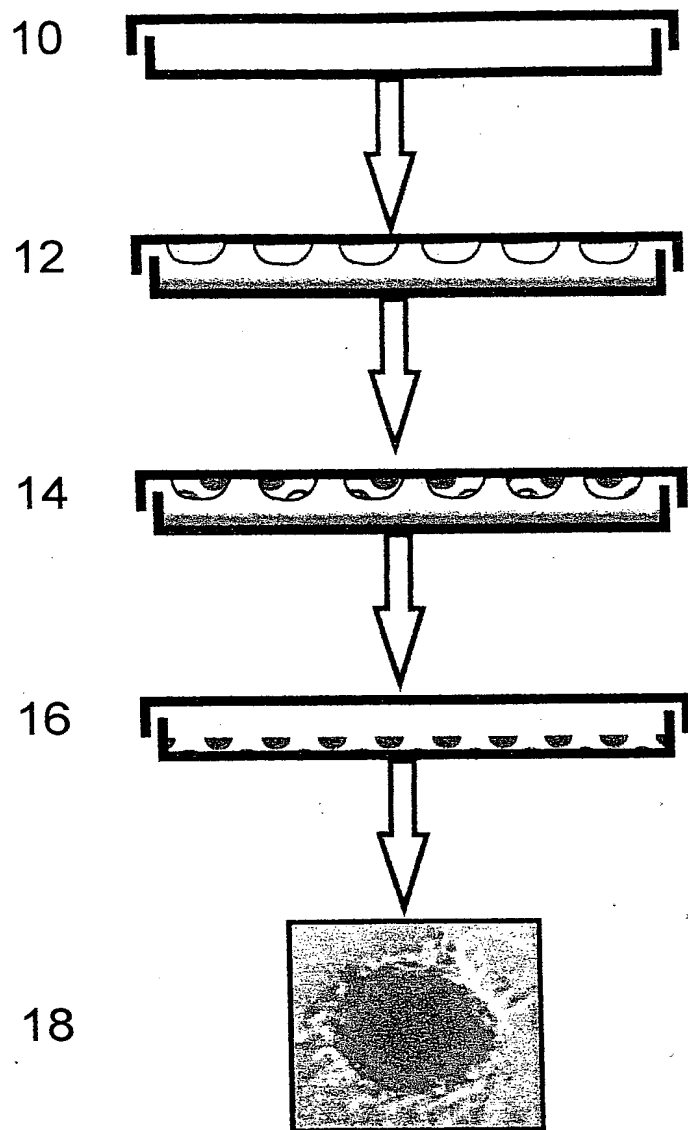


Fig. 1

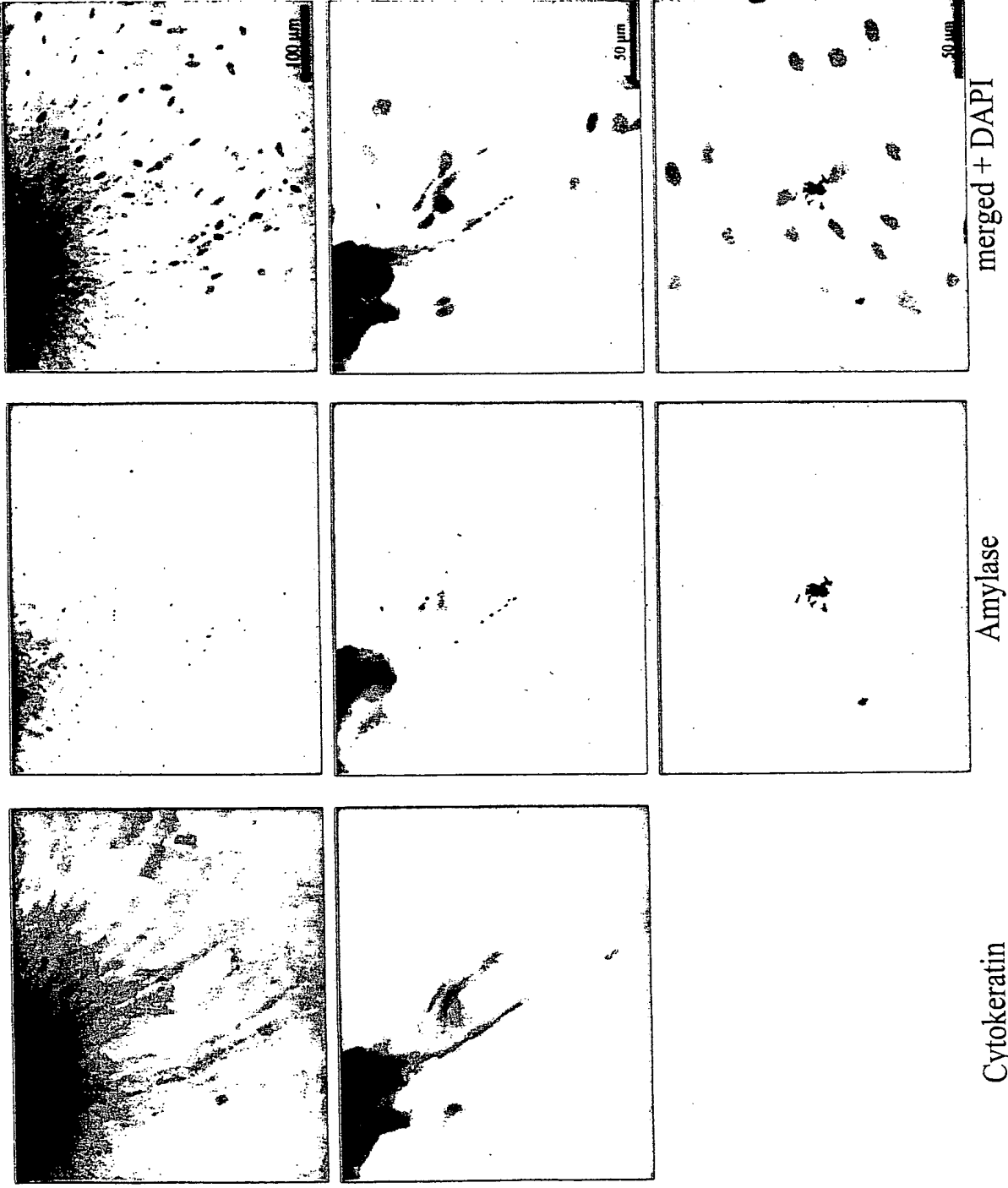


Fig. 2

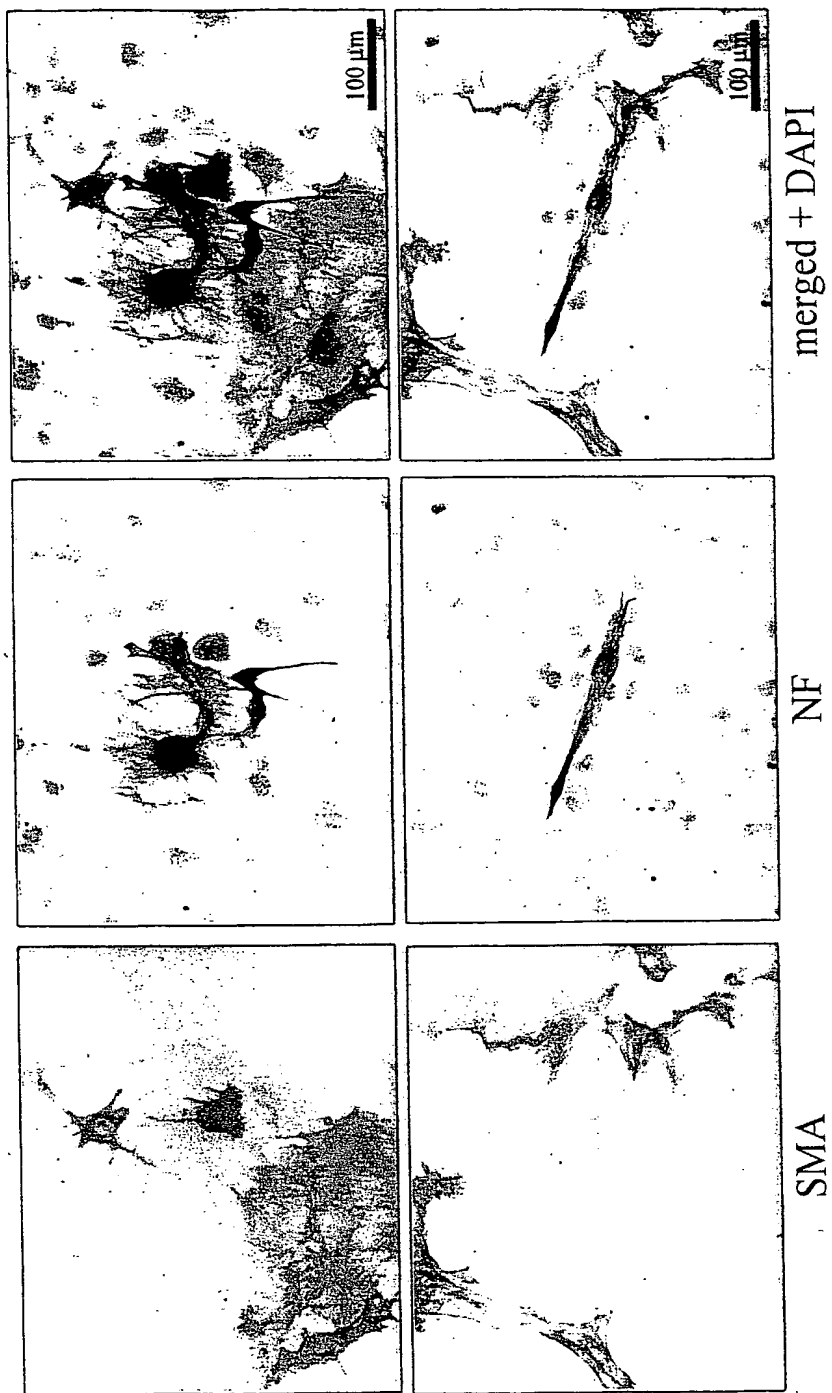


Fig. 3